

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. August 2005 (11.08.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/073708 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 27/49**,
C12Q 1/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/050333

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. Januar 2005 (26.01.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 004 654.9 29. Januar 2004 (29.01.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **SIEMENS AKTIENGESellschaft** [DE/DE];
Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).

(72) Erfinder; und

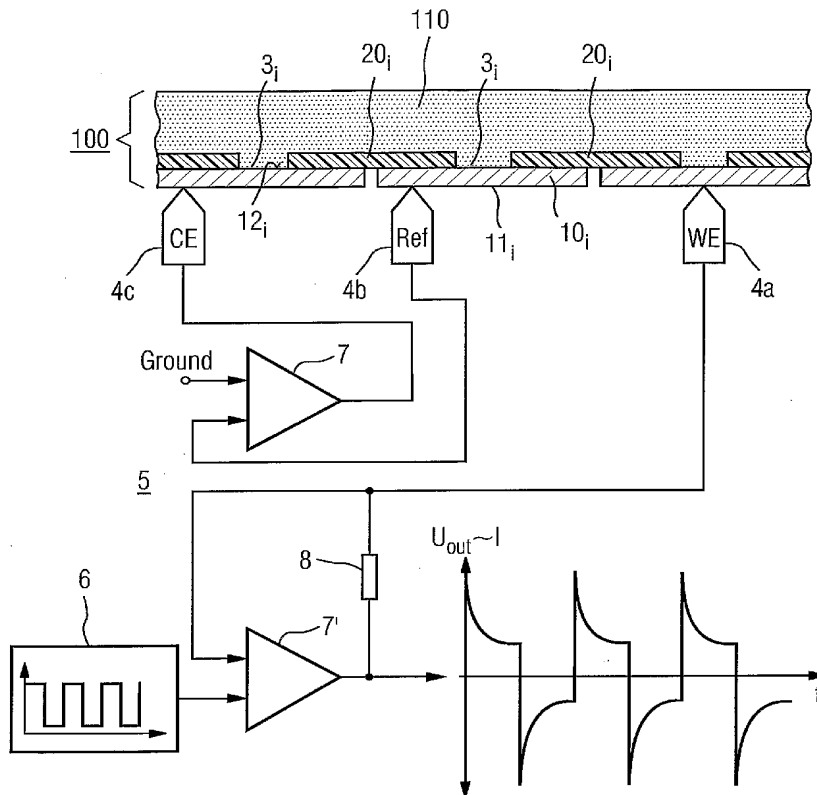
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BARLAG, Heike**
[DE/DE]; Äussere Laufer Gasse 10, 90403 Nürnberg
(DE). **GUMBRECHT, Walter** [DE/DE]; In der Röte 1,
91074 Herzogenaurach (DE). **MUND, Konrad** [DE/DE];
Langenbrucker Weg 10, 91080 Uttenreuth (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **SIEMENS AKTIENGES-**
SELLSCHAFT; Postfach 22 16 34, 80506 München
(DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR MEASURING THE CONCENTRATION OR CHANGE IN CONCENTRATION OF A REDOX-ACTIVE SUBSTANCE AND CORRESPONDING DEVICE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MESSUNG DER KONZENTRATION ODER KONZENTRATIONSÄNDERUNG EINER REDOXAKTIVEN SUBSTANZ UND ZUGEHÖRIGE VORRICHTUNG



(57) Abstract: In order to follow the change in concentration of a redox-active substance, potential suitable for a reducing process or oxidation process are applied to the working electrode of a measuring device. According to the invention, the potential of the working electrode is pulsed and measuring phases and relaxation phases are alternately produced, the pulse lengths of the measuring phase and relaxation phase being predetermined in a suitable manner. In this manner, a rapid relaxation of the concentration gradient is forced electrochemically so that the measurement can be carried out on simple transducer arrays. The device for carrying out the inventive method comprises a transducer array in addition to a suitable potentiostat. Said transducer array may comprise a planar metal substrate (1) on which at least one flexible insulator (2) having

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/073708 A2



(81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,

ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

a firm connection between the metal surface and the insulator surface is located. The array is generated by suitably structuring the substrate.

(57) **Zusammenfassung:** Zur Verfolgung der Konzentrationsänderung einer redoxaktiven Substanz werden an einer Arbeitselektrode einer Messvorrichtung geeignete Potenziale für einen Reduktionsvorgang oder einen Oxidationsvorgang angelegt. Gemäss der Erfindung wird das Potenzial der Arbeitselektrode gepulst und es werden abwechselnd Messphasen und Relaxationsphasen gebildet, wobei die Pulslängen von Messphase und Relaxationsphase in geeigneter Weise vorgegeben werden. Es wird somit eine schnelle Relaxation des Konzentrationsgradienten elektrochemisch erzwungen, so dass an einfachen Transducer-Arrays gemessen werden kann. Bei einer Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens ist neben einem geeigneten Potentiostaten ein TransducerArray vorhanden. Das Transducer-Array kann aus einem planaren Metallsubstrat (1) bestehen, auf dem mindestens ein flexibler Isolator (2) mit fester Verbindung von Metalloberfläche und Isolatoroberfläche angeordnet ist. Das Array wird durch geeignete Strukturierung erzeugt.

Beschreibung

Verfahren zur Messung der Konzentration oder Konzentrations-
änderung einer redoxaktiven Substanz und zugehörige Vorrich-
5 tung

Die Erfindung bezieht sich auf ein elektrochemisches Messver-
fahren zur Messung der Konzentration oder Konzentrationsände-
rung einer redoxaktiven Substanz. Daneben bezieht sich die
10 Erfindung auch auf eine zugehörige Vorrichtung zur Durchfüh-
rung des Messverfahrens mit einem elektrochemischen Transdu-
cer-Array.

Amperometrische Sensoren basieren auf dem einfachen Prinzip,
15 dass reduzierbare oder oxidierbare Substanzen durch Anlegen
eines entsprechenden Potentials an einer Elektrode umgesetzt
werden können. Der dabei fließende so genannte Faraday'sche
Strom ist ein Maß für die Konzentration dieser Substanz. Die-
ser Strom kann jedoch nicht direkt nach Anlegen des Potenzi-
20 als gemessen werden, da zunächst vor allem ein hoher kapazi-
tiver Strom fließt. Dieser wird durch die Umladung der Dop-
pelschicht der Elektrode verursacht. Er klingt exponentiell
mit der Zeit ab.

25 Der Faraday'sche Strom verringert sich ebenfalls mit der
Zeit, da durch den Umsatz von Substanz eine Verarmung vor der
Elektrode stattfindet. Die Nachlieferung von Substanz aus der
Lösung zur Elektrode findet bei nicht gerührten, also nicht
konvektiven Systemen, allein durch die Diffusion statt. Es
30 stellen sich in der Lösung Konzentrationsprofile ein. Bei ge-
nügend positiven (Oxidation) bzw. negativen (Reduktion) Po-
tenzialen gilt für die Zeitabhängigkeit des Stromes die
Cottrell-Gleichung.

$$I = nFA \frac{\sqrt{D}}{\sqrt{\pi t}} c_{\infty}, \quad s \rightarrow \infty \quad (1)$$

35 Dabei bedeuten:

n: Zahl der Elektronen pro Formelumsatz

F: Faraday-Konstante

A: Fläche der Elektrode

D: Diffusionskoeffizient

c_{∞} : Konzentration der umzusetzenden Substanz in der Lösung

5 s: Ausdehnung des Elektrolytraums vor der Elektrode

Gleichung (1) beinhaltet, dass der Faradaysche Strom mit der reziproken Quadratwurzel aus der Zeit abnimmt, also langsamer als der kapazitive Strom. Einige Zeit nach der Veränderung
10 des Potentials wird der Strom daher hauptsächlich vom Faradayschen Strom bestimmt. Für jedes System gilt es, einen Zeitpunkt zu finden, bei dem der kapazitive Strom gering ist, der Faradaysche Strom jedoch noch möglichst hoch.

15 Eine Möglichkeit zur Bestimmung sehr kleiner Konzentrationen (10^{-10} mol/l) ist die voltammetrische Stripping-Analyse. Dabei wird durch Anlegen eines geeigneten Potentials die zu bestimmende Substanz zunächst an der der Elektrode angereichert. In einem zweiten Schritt wird dann die Substanzmenge auf der
20 Elektrode bestimmt [W. Buchberger, Elektrochemische Analyseverfahren, Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag 1998 und DE 44 24 355]. Dieses Verfahren ermöglicht auf Grund der zwei Verfahrensschritte keine zeitliche Auflösung. Konzentrationsänderungen können damit nicht oder nur sehr langsam verfolgt werden.
25

Ein weiteres analytisches Standardverfahren zur Bestimmung sehr kleiner Konzentrationen ist die Polarographie [Rach u. Seiler, Polarographie u. Voltametrie in der Spurenanalytik,
30 Heidelberg: Hüthig 1984]. Hier werden mit geeigneten Pulsverfahren und unter Verwendung einer sog. "Dropping Mercury Elektrode" (DME) Konzentrationen in der Größenordnung 10^{-9} mol/l messbar. Bei der DME macht man sich u. a. zunutze, dass jeder Quecksilbertropfen neu in die Lösung eintaucht und
35 dort wieder die Konzentration c_{∞} vorfindet. Bei einer statischen Elektrode ist dies jedoch nicht der Fall. Nach jeder Messung müsste man so lange warten bis das Konzentrationspro-

fil durch den Diffusionsprozess relaxiert ist. Je nach Größe des Diffusionskoeffizienten kann dieser Vorgang, wenn nicht gerührt wird, etliche Sekunden in Anspruch nehmen. Ist die Wartezeit nicht lang genug, so wird der Strom von Messung zu Messung abnehmen, da die Anfangskonzentration vor der Elektrode sinkt.

Bei einigen Anwendungen kann es aber erforderlich sein, in schneller Abfolge die Konzentration zu bestimmen, wenn zum Beispiel eine Konzentrationsänderung beobachtet werden soll. Ein mögliches Einsatzgebiet ist die Verfolgung der enzymatischen Bildung eines Mediators in molekularbiologischen Detektionssystemen.

Bei biochemischen Sensoren werden molekulare Erkennungssysteme, z. B. Haptene, Antigene oder Antikörper, auf oder in der Nähe der Elektroden platzieren. Das Zielmolekül bindet daran und wird entweder direkt oder über Zwischenschritte mit einem Enzymlabel versehen. Wird nun das entsprechende Enzymsubstrat zugegeben, setzt das Enzym eine Substanz frei, die detektiert werden kann. Dies geschieht entweder optisch oder elektrochemisch. Es handelt sich hier um den so genannten ELISA-Test (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Auf ähnlichem Weg lassen sich auch DNA-Analyseverfahren durchführen.

Bei der elektrochemischen Detektion ist es vorteilhaft nicht nur die absolute Konzentration der als "Mediators" bezeichneten Messgröße für die vorstehend angegebenen elektrochemischen Umsetzungen zu erfassen, sondern die Änderung, insbesondere die Zunahme der Konzentration während weniger Sekunden zu bestimmen. Dadurch wird der Einfluss unterschiedlicher Zustände des biochemischen Systems zu Beginn der Messung eliminiert. Die zeitliche Auflösung einer solchen Messung muss dabei 1 bis 2 Hz betragen, um technisch und wirtschaftlich sinnvoll zu sein.

Speziell bei redoxaktiven Substanzen kann bisher unter Verwendung von Interdigitalelektroden das so genannte Redoxcycling eingesetzt werden. Dabei wird ausgenutzt, dass die an einer Elektrode oxidierte Substanz an der zweiten Elektrode
5 wieder reduziert werden kann. Die Elektroden werden dabei konstant auf das Oxidations- bzw. Reduktionspotenzial eingestellt. Dazu werden die beiden Interdigitalelektroden mit kammerartig ineinandergreifenden Elektrodenfingern zusammen mit der Referenzelektrode und einer Gegenelektrode an einen
10 Bipotentiostaten angeschlossen. [O.Niwa, M. Morita H. Tabei, Anal. Chem. 62 (1991), 447-452 und DE 43 18 519 A1].

Eine Voraussetzung für das Redoxcycling ist, dass der Abstand zwischen den Elektroden, d.h. der einander zugeordneten
15 Elektrodenfinger der Interdigitalelektroden, in der Größenordnung der Diffusionsschichtdicke, also im Bereich weniger μm , liegt. Auf Grund der Konzentrationsprofile geht in den gemessenen Strom neben der Konzentration und dem Diffusionskoeffizienten die Zahl der Elektrodenfinger und deren Länge
20 ein [K. Aoki, J. Electroanal. Chem, 270 (1989), 35]. Daraus ergibt sich, dass die erforderlichen Strukturen sehr fein und aufwändig in der Herstellung sein müssen.

Die Monographie "Electrochemical Methods, Fundamentals and
25 Applications", John Wiley & Sons, 1980 liefert einen allgemeinen Überblick über die elektrochemische Messtechnik. Weitere Hinweise zur Messung speziell an Flüssigkeiten oder auch für biochemische Messungen werden in der DE 43 35 241 A1, in der DE 41 31 731 A1, in der DE 197 17 809 U1 und in der
30 DE 199 17 052 A1 gegeben. Ein Verfahren zur elektrochemischen Messung des Redoxcyclings mit einer praxisgerechten Elektrodenanordnung ist im Einzelnen in der WO 01/67587 A1 beschrieben.

35 Ausgehend von letzterem Stand der Technik ist es Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren vorzuschlagen, bei dem die Bestimmung von Konzentrationen einer redoxaktiven Substanz in μM -

Konzentrationen an flächigen Elektroden mit Durchmessern $\geq 30 \mu\text{m}$, vorzugsweise $\geq 50 \mu\text{m}$, möglich ist. Dabei soll das System nicht konvektiv sein, also weder Elektrode noch Lösung gerührt bzw. bewegt werden und die Messfrequenz $\geq 1 \text{ Hz}$ betragen. Daneben soll eine zugehörige Messvorrichtung geschaffen werden.

Die Aufgabe ist erfindungsgemäß bei einem Verfahren der eingangs genannten Art durch die Maßnahmen des Patentanspruches 1 gelöst. Eine zugehörige Messvorrichtung ist im Patentanspruch 11 angegeben. Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens und der zugehörigen Messvorrichtung sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

Es wird vorgeschlagen, das Potenzial der Arbeitselektrode in an sich bekannter Weise zu pulsen. Bei der Erfindung werden aber nun abwechselnd Messphasen sowie Relaxationsphasen gebildet, wobei die Messphasen-Pulslängen so gewählt werden, dass gegen Ende des Pulses der kapazitive Strom klein gegenüber dem Faraday'schen Strom ist und wobei die Relaxationsphasen-Pulslängen so gewählt werden, dass gegen Ende des Pulses der Konzentrationsgradient relaxiert ist, so dass zu Beginn der folgenden Messphase die Konzentrationsänderung des Mediators, verursacht durch den Verbrauch des Mediators durch die Messung selbst, weitestgehend rückgängig gemacht wird. Damit bildet der am Ende der Messphase gemessene Strom ein signifikantes Messsignal.

Gemäß der Erfindung erfolgt die schnelle Messung der Konzentration und insbesondere der Konzentrationsänderung eines Mediators in molekularbiologischen Detektionssystemen mittels der elektrochemischen Redoxreaktion der enzymatisch gebildeten redoxaktiven Substanz bei den auf einem Chipband in Kavernen verankerten Arbeitselektroden durch eine zyklische Pulsbelastung, wobei der nach Abklingen der Umladung der Doppelschicht gemessene Strom das Messsignal bildet.

Grundlage der Erfindung ist die Erkenntnis, dass durch Verwendung einer neuen Variante des Redoxcyclings vorteilhafterweise an Elektroden mit Durchmessern in der Größenordnung einiger 100 µm bis zu 1 cm gemessen werden kann. Komplex aufgebaute Interdigitalelektroden sind nicht mehr notwendig. Nunmehr können preisgünstige Transducer-Arrays verwendet werden, wie sie insbesondere in der Patentanmeldung Akt.Z. 10 2004 004 654.9-52 der Anmelderin mit gleicher Anmeldepriorität im Einzelnen beschrieben sind.

10

Bei der zugehörigen Messvorrichtung vereinfacht sich der Messaufbau gegenüber dem Redoxcycling dahingehend, dass kein Bipotentiostat benötigt wird. Ein einfacher Potentiostat in Kombination mit einem Pulsgenerator reicht aus.

15

Bei der Erfindung wird nicht - wie beim "normalen" Redoxcycling - ein stationärer Zustand eingestellt, sondern eine schnelle Relaxation des Konzentrationsgradienten elektrochemisch erzwungen. Dazu wird das Potenzial der Arbeitselektrode gepulst. Es bildet sich eine Diffusionsschicht aus, deren Dicke am Ende der Messperiode einen Maximalwert erreicht, der von der Länge der Messphase abhängt. Bei einer Messung von Oxidationsströmen wird während der Relaxationsphase ein hinreichendes Reduktionspotenzial eingestellt. Die während der Messphase oxidierten und noch vor der Elektrode befindlichen Spezies werden so wieder reduziert. Der Konzentrationsgradient und damit die Diffusionsschicht werden abgebaut. Statt also wie beim Redoxcycling konstante Diffusionsschichtdicken zu etablieren, wird beim erfindungsgemäßen gepulsten Redoxcycling die Diffusionsschicht zeitlich auf- und wieder abgebaut. In beiden Fällen wird dadurch eine zumindest in ihrem Maximalwert begrenzte Diffusionsschichtdicke eingestellt. Soll eine Reduktion beobachtet werden, so muss während der Messphase das Reduktionspotenzial und während der Relaxationsphase das entsprechende Oxidationspotenzial eingestellt werden.

35

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Figurenbeschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung in Verbindung mit den Patentansprüchen. Es zeigen

5

Figur 1 eine graphische Darstellung des gepulsten Redox-cyclings mit Kennlinien für Pulslängen und zugehörigen Konzentrations- und Signalkurven,

10

Figur 2 eine graphische Darstellung der Abhängigkeit der relativen Konzentration vom Abstand der Elektroden,

Figur 3 eine graphische Darstellung des Stromes von der Konzentration und

15

Figur 4 eine graphische Darstellung der Steigung in Abhängigkeit vom Potenzial während der Relaxationsphase,

Figur 5 eine graphische Darstellung der Abhängigkeit der Stromdichte von der Zeit,

20

Figur 6 eine Darstellung entsprechend Figur 5 für die Relaxationsphase,

Figur 7 eine Darstellung entsprechend Figur 5 mit Vergleich von experimentellen und berechneten Werten,

25

Figur 8 eine graphische Darstellung der Abhängigkeit der Konzentration vom Elektrodenabstand

Figur 9 eine Messvorrichtung für das gepulste Redox-Cycling mit einem zugehörigen Transducer-Array,

Figur 10/11 das Transducer-Array für die Messvorrichtung gemäß Figur 9 in der Sicht von oben und unten, und

30

Figur 12 den Verlauf einer typischen Messung mit einer Messstromkurve.

In den Figuren 1 bis 4 wird zunächst die Methodik des gepulsten Redox-Cyclings beschrieben. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Methodik des Redox-Cyclings an sich vom Stand der Technik bekannt ist. Anschließend sind anhand der Figuren 5 bis 8 Betrachtungen zur Genauigkeit wiedergegeben und ist

schließlich in Figur 9 eine Messvorrichtung mit einem exemplarischen Transducer-Array, dessen Struktur in den Figuren 10 und 11 gezeigt ist, angegeben. Figur 12 gibt schließlich die Verfahrensführung bei der Anwendung der Anordnung als DNA-Sensor wieder.

In Figur 1 sind die unterschiedlichen Phasen während der Messung gekennzeichnet. Welche die Mess- und welche die Relaxationsphase ist, hängt davon ab, ob ein Oxidations- oder Reduktionsstrom gemessen werden soll. Die Pulslängen für Oxidation und Reduktion müssen nicht gleich sein, d.h. die Zeiten Δt_{Ox} und Δt_{Red} können sich unterscheiden. Auch die Potenziale ϕ_{Ox} und ϕ_{Red} müssen nicht symmetrisch zum Redoxpotenzial ϕ_0 der Spezies sein.

Die Darstellung der Figur 1 zeigt den möglichen Potenzialverlauf unter Verwendung von Rechteckpulsen. Dabei sind die Potenziale ϕ_{Ox} , ϕ_{Red} und die Zeiten Δt_{Ox} und Δt_{Red} mit der Pulsform 11 in willkürlichen Einheiten aufgetragen. Die Pulsform 11 mit den Pulslängen zur Oxidation und Reduktion muss nicht symmetrisch sein. Es ist ebenso möglich, das gepulste Redox-cycling mit Dreiecksspannungskurven oder Sinuskurven zu realisieren.

Im Einzelnen ist in Figur 1 die Messphase mit A und die Relaxationsphase mit B bezeichnet. Neben der Potenzialkurve 11 sind weiterhin eine Kurve 12 für die Konzentration des Mediators der Elektrode und zusätzlich der elektrische Strom 13 als Messsignal dargestellt. Der für den Prozess maßgebliche Stromwert liegt also jeweils am Ende des Relaxationsintervalls vor und ist ein Maß für die relaxierte Konzentrationsänderung.

Bei den weiteren Betrachtungen wird davon ausgegangen, dass die Konzentration eines in seiner reduzierten Form vorliegenden Moleküls gemessen werden soll. In diesem Fall ist während der Messphase das Potenzial positiv bezogen auf das Redoxpo-

tenzial der Spezies. Die höchsten Messströme werden erreicht, wenn das Potenzial so weit im Positiven liegt, dass sich ein Diffusionsgrenzstrom einstellt. Der Strom ist dann nicht von der Kinetik der Redoxreaktion, sondern nur von der Diffusion begrenzt. Die zeitliche Entwicklung des Konzentrationsprofils der reduzierten Spezies ergibt sich aus der entsprechenden Lösung der Fickschen Gesetze für die Diffusion in den einfach unendlichen Halbraum.

$$c(t,x) = c_{\infty} \cdot \operatorname{erf}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right), \quad s \rightarrow \infty \quad (2)$$

Dabei bedeuten:

c : Konzentration als Funktion von Zeit und Ort

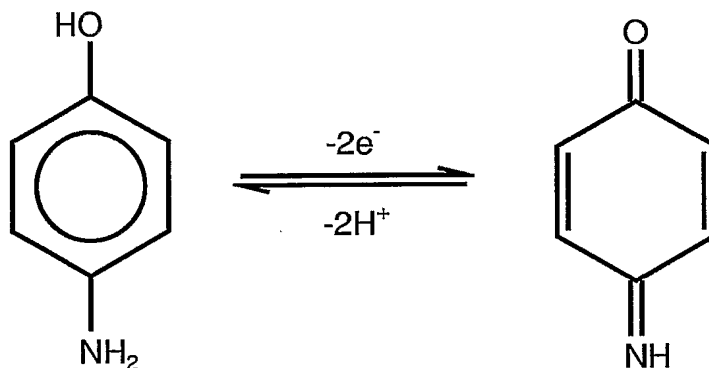
c_{∞} : Konzentration in der Lösung ($x \rightarrow \infty$)

erf: Fehlerfunktion

D : Diffusionskoeffizient

s : Ausdehnung des Elektrolytraums vor der Elektrode

In Figur 2 sind zwei Konzentrationsprofile 21 und 22 für eine Substanz mit dem Diffusionskoeffizienten $D = 3,6E-6 \text{ cm}^2/\text{s}$ gezeigt. Dies entspricht dem Diffusionskoeffizienten des Paraaminophenols (pAP), an dessen Beispiel die Funktionsweise des gepulsten Redoxcyclings im Weiteren demonstriert werden soll.



Paraaminophenol

Chinonimin

Nach 0,1 s hat die Diffusionsschicht eine Dicke von ca. 25 μm . Nach 0,25 s beträgt die Ausdehnung der an pAP verarmten Schicht schon 40 μm . Je dicker diese Schicht ist, desto länger dauert die Relaxation durch Diffusion.

5

Die Figur 3 zeigt die Stromdichte als Funktion der pAP-Konzentration in der Lösung für verschiedene Pulsfolgen, die durch Kennlinien 31 bis 34 gekennzeichnet sind. Die Messphase beträgt immer 0,25 s, die Relaxationsphase 0,75 s. Die Strom-

10 messung erfolgt 0,24 s nach Beginn der Messphase. Das Oxidationspotenzial während der Messphase beträgt bezogen auf das Redoxpotenzial +200 mV. Variiert wurde das Potenzial während der Relaxationsphase. Es nimmt Werte zwischen -300 mV und 0 mV bezogen auf das Redoxpotenzial ein. Im Einzelnen ist

15 $\varphi_{\text{red}}/\varphi_{\text{ox}}$ bei Kennlinie 31 -300 mV/200 mV,
bei Kennlinie 32 -200 mV/200 mV,
bei Kennlinie 33 -100 mV/200 mV
und bei Kennlinie 34 0 mV/200 mV.

Es ergeben sich bei diesen Parametern unterschiedliche Steigungen der Stromdichte 5 in ihrer funktionalen Abhängigkeit

20 von der Konzentration pAP.

Die Steigung der Stromdichte mit der pAP-Konzentration, also die Empfindlichkeit der Messung, nimmt stetig mit negativer

25 werdendem Potenzial während der Relaxationsphase zu. Eine Auftragung der Steigung gegen das Relaxationspotenzial entsprechend Figur 4 zeigt mit der Kennlinie 41 deutlich die vorteilhafte Wirkung des gepulsten Redoxcyclings.

30 Während bei einem Relaxationspotenzial von 0 V vs. φ_0 die Steigung nur 462 Acm/mol beträgt, erhöht sich dieser Wert auf 864 Acm/mol bei -300 mV vs. φ_0 . Diese Verdopplung beruht auf der verbesserten Wirkung des Redoxcyclings, weil bei einem Relaxationspotenzial von -300 mV vs. φ_0 das Chinonimin vor

35 der Elektrode vollständig zu Paraaminophenol (pAP) reduziert wird. Bei einem Relaxationspotenzial von 0 V vs. φ_0 wird hingegen gemäß der Nernstschen Gleichung direkt vor der Elektro-

de ein Konzentrationsverhältnis Paraaminophenol:Chinonimin = 1:1 eingestellt. Das Chinonimin wird also nur teilweise wieder reduziert.

- 5 Die Steigerung der Empfindlichkeit ist nur ein Vorteil des gepulsten Redoxcyclings. Die Konstanz des Stromsignals schon während der ersten Sekunden der Messung ist ein weiterer wesentlicher Vorteil.
- 10 Für die Bestimmung der Empfindlichkeit wurde die sich nach längerer Messzeit eingestellte Stromdichte eingesetzt. Bei der Messung von Enzymaktivitäten z.B. erfolgt die Messung aber so, dass die Lösung zunächst noch gerührt bzw. gepumpt wird. Das vom Enzym gebildete pAP wird dadurch weggespült und
- 15 es stellt sich ein konstanter Grundstrom ein. Dann wird die Pumpe gestoppt und die ansteigende Konzentration während der ersten Sekunden gemessen. Typische Steigungen liegen dabei in der Größenordnung von $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2\text{s}$. Führt nun die Messung selbst zu einem Absinken des Signals, so überlagern sich beide Ef-
- 20 fekte und es wird eine zu geringe Steigung des Stromes und damit Enzymaktivität gemessen. Da dieses Absinken des Stromes durch den Verbrauch der Substanz außerdem von dessen Konzentration abhängt, lässt sich dieser Effekt nicht durch Normierungen eliminieren.
- 25 Experimente mit konstanter Konzentration geben Aufschluss über die zeitliche Signalkonstanz. Die Konzentration betrug $50 \mu\text{M}$ pAP, das Potenzial während der Messphase $+200 \text{ mV}$. Die Dauer der Messphase betrug 250 ms , wobei die Strommessung
- 30 nach 240 ms erfolgte. Das Potenzial während der Relaxationsphase betrug im ersten Experiment 0V vs. ϕ_0 , im zweiten -300 mV vs. ϕ_0 . Die Dauer der Relaxationsphase wurde zwischen 250 ms und $4,75 \text{ s}$ variiert.
- 35 In Figur 5 ist in einer graphischen Darstellung die Abhängigkeit der Stromdichte j von der Zeit wiedergegeben: Es ergeben sich Kennlinien 51 bis 54 für unterschiedliche Relaxations-

phasendauern Δt_{Red} , und zwar im Einzelnen zwischen 0,255 und 4,755. Die Ströme fallen innerhalb der ersten 10 s der Messung stark ab. Bei einer Länge der Relaxationsphase von 0,25 s beträgt die Abnahme $14 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 10 s. Wird die Dauer der Relaxationsphase auf 4,75 s erhöht, so erniedrigt sich die Abnahme des Signals auf $9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 10 s. Je kürzer also die Dauer der Relaxationsphase ist, desto stärker ist diese Abnahme des Signals mit der Zeit. Aber selbst bei langen Relaxationszeiten ist die Abnahme von $0,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2\text{s}$ noch erheblich verglichen mit den Steigungen, die in der Größenordnung $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2\text{s}$ in der Anwendung gemessen werden sollen.

Wird nun das Potenzial während der Relaxationsphase auf -300 mV heruntergesetzt, verbessert sich die Signalkonstanz signifikant. Die ergibt sich insbesondere aus Figur 6, die eine Figur 5 entsprechende Darstellung mit Kennlinien 61 bis 64 für die gleichen Parameter der Relaxationsphasen Δt_{Red} zeigt:

Bei einer Relaxationszeit von 0,25s beträgt der Signalabfall noch $8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 10 s. Mit einer Relaxationszeit von 0,75 s beträgt dieser Wert noch $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 10 s, bei 1,75 noch $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 10 s und für 4,75 s nur noch $0,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 10 s. Schon bei einer Relaxationszeit von 0,75 s, also einer Messfrequenz von 1 Hz, und einem Relaxationspotenzial von -300 mV beträgt der Signalabfall und damit auch der Fehler nur noch ca. 1 % vom erwarteten Messwert.

Die Experimente zeigen den Einfluss von Dauer und Potenzial der Relaxationsphase auf das Messsignal. Weiteren Aufschluss über die Wirkung des gepulsten Redoxcyclings können Simulationsrechnungen geben. Dabei wird zum einen die Stromdichte beim Redoxcycling berechnet zum anderen wird zum Vergleich die Stromdichte ohne Redoxcycling bestimmt.

Für die Simulationen mit Redoxcycling wurde angenommen, dass der Elektrolytraum eine Dicke von $100 \mu\text{m}$ hat. Sowohl Oxidati-

ons- als auch Reduktionspotenzial sind so gewählt, dass die Reaktion im Diffusionsgrenzstrombereich abläuft, die Ströme also maximal sind. Die Pulslängen sind 250 ms beim Oxidationspotenzial und 750 ms beim Reduktionspotenzial. Bei den Berechnungen ohne Redoxcycling waren die Parameter gleich, bis auf die Tatsache, dass während der Relaxationsphase kein Potenzial vorgegeben wird und über den Potentiostaten kein Strom fließen kann. In dieser Zeit ist das System also elektrochemisch entkoppelt.

Der Vergleich der Simulationsdaten erfolgt mit den experimentellen Ergebnissen für die entsprechenden Pulslängen und die Potenziale $\varphi_{\text{Ox}} = +200 \text{ mV}$ und $\varphi_{\text{Red}} = -300 \text{ mV}$. Diese Potenzialgrenzen entsprechen am ehesten den Vorgaben für die Simulation. Die y-Achsenabschnitte der Simulationsdaten wurden den experimentellen Ergebnissen angepasst.

Die Figur 7 zeigt eine gute Übereinstimmung von Experiment und Simulation für das gepulste Redoxcycling, wobei 71 die gemessenen Werte und 72 die gerechneten Kennlinien darstellen. Der Abfall der Stromdichte ist unter diesen Bedingungen mit $2 \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 4 s gering. Ohne Redoxcycling hingegen beträgt der Stromdichteabfall während der ersten 4 s schon $12 \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2$, was durch die Kennlinie 73 verdeutlicht ist. Dazwischen liegen die Ergebnisse für ein gepulstes Redoxcycling mit Potentiostatierung während der Relaxationsphase beim Redoxpotenzial, was durch Kennlinie 74 wiedergegeben ist.

Die Verbesserung der Signalkonstanz um den Faktor 6 lässt sich direkt auf die Konzentrationsprofile zurückführen. Die folgende Abbildung zeigt die berechneten Konzentrationsprofile von pAP als Funktion des Abstandes von der Elektrode wie sie sich am Ende der 5. Relaxationsphase darstellen.

Beim gepulsten Redoxcycling wird während der Relaxationsphase das vorher gebildete Oxidationsprodukt wieder reduziert. In Folge ist die Konzentration an pAP direkt vor der Elektrode

am Ende der Relaxationsphase wieder auf den ursprünglichen Wert c_{∞} angestiegen. Weiter von der Elektrode entfernt ist die Konzentration nur leicht erniedrigt. Ohne Redoxcycling hingegen beträgt die Konzentration vor der Elektrode unmittelbar vor der nächsten Messphase nur noch 38 %. Auch weiter entfernt von der Elektrode ist die Konzentration deutlich abgesenkt.

Letzteres ergibt sich im Einzelnen aus Figur 8 mit Kennlinien 81 und 82: Dabei entspricht das Beispiel entsprechend Kennlinie 82 für eine Messung ohne Redoxcycling in der Praxis der Messung der Konzentration einer Substanz, die zwar oxidiert werden kann, deren Oxidationsprodukte aber nicht wieder reduzierbar sind. Analoges wäre auch der Fall bei einer Substanz, die reduziert, deren Reduktionsprodukte aber nicht wieder oxidiert werden könne. Im Fall eines biochemischen Sensors könnte das z. B. Naphthol sein, das wie auch das pAP bei einer enzymatischen Reaktion freigesetzt werden kann.

Aus der Figur 9 ist die Messvorrichtung im Einzelnen ersichtlich: Außer durch ein Transducerarray 100, das anhand der Figuren 10 und 11 noch im Einzelnen beschrieben wird, wird die Messvorrichtung im Wesentlichen durch einen geeigneten Potentiostaten 5 in Kombination mit einem Pulsgenerator 6 realisiert, der optional Rechteck-, Dreieck- oder Sinuspulse liefert. Durch zwei Operationsverstärker 7 bzw. 7', von denen einer mit Groundpotenzial verbunden ist und einem definierten Messwiderstand 8 wird der Potentiostat 5 derart konzipiert, dass geeignete Potenziale bereitgestellt werden. Dabei können die Pulslänge, die Wiederholrate und die Höhe des Potentials vorgegeben werden. Insbesondere die Pulslängen der Messphasen und die Relaxationsphasen können separat eingestellt werden und unterschiedlich lang sein. Auch die Potenziale können unterschiedlich groß sein.

Dem Transducerarray 100 sind einzelne Elektroden zugeordnet, die bestimmungsgemäß eine Referenzelektrode RE (= reference

electrode), eine Gegenelektrode CE (= counter electrode) und wenigstens eine Messelektrode WE (= working electrode) realisieren. Diese Elektroden sind als Drei-Elektrodenanordnung mit dem Potentiostaten 5 verbunden. Das Signal des Potentiostaten 5 wird an eine in Figur 9 nicht im Einzelnen dargestellte Signalverarbeitungseinheit angeschlossen, mit welcher eine Auswertung unter Berücksichtigung obiger Ausführungen zur Messmethodik und Genauigkeit erfolgt. Im Allgemeinen ergibt sich der in Figur 9 als I_{out} dargestellte Signalverlauf zur Auswertung.

In den Figuren 10/11 ist das Transducerarray 100 als Teil der Messvorrichtung wiedergegeben, das planar und flexibel ist sowie insbesondere kostengünstig herzustellen ist. Wesentlich ist dabei, dass nunmehr für das gepulste Redoxcycling mit einem vereinfachten Transducer-Array 100 gemessen werden kann. Die Figuren 10 und 11 zeigen die Ober- und Unterseite des Transducerarrays 100 - bestehend aus einem Metallsubstrat 1 und einer Isolatorschicht 2. Auf der Oberseite sind beispielsweise kreisförmige Vertiefungen 3_i , die als Kavitäten bezeichnet werden, dargestellt. Die Kavitäten 3_i entstehen durch die Strukturierung des Isolators 2. Auf dem Grund der Vertiefungen 3_i liegt die Oberseite des Metallsubstrats frei und bildet einen Messpunkt, sofern ein Analyt aufgebracht ist.

Die Darstellung der Rückseite zeigt durch Striche eine Strukturierung und damit eine Auftrennung des Metallsubstrats 1 in voneinander isolierte Teile. Jede Metallinsel korrespondiert mit einer Vertiefung 31 auf der Vorderseite. Durch Punkte sind die möglichen Kontaktstellen für eine sog. Nadelkarte zur vereinfachten elektrischen Kontaktierung der Metallflächen angedeutet. Wesentlich ist dabei, dass mehrere Metallinseln, vorzugsweise drei, mit einem Analyten einen Sensor definieren und mit den zugehörigen Elektroden 15, d.h. eine Messelektrode WE, eine Gegenelektrode GE und eine Referenz-

elektrode RE zur Durchführung von elektrochemischen Messungen geeignet sind.

Weitere spezifische Elektrodenanordnungen sind in einer parallelen Anmeldung der Anmelderin mit gleicher Anmeldepriorität und der Bezeichnung "Elektrochemisches Transducer-Array und dessen Verwendung" beschrieben.

Mit einer Anordnung gemäß Figur 9 und einem Transducer-Array 100 gemäß Figur 10/11 wird beispielhaft ein biochemischer Sensor zur DNA-Analyse realisiert: Es wird das anhand der Figuren 10/11 beschriebene Transducer-Array 100 aus einer Metallschicht und einer damit verbundenen Isolatorschicht mit Kavitäten 3i eingesetzt. Der Durchmesser der Kavitäten 3i beträgt 0,8 mm, die Tiefe 90 µm und der Abstand zwischen zwei benachbarten Elektroden 1mm. Die Elektrodenoberflächen sind mit einer 2,3 µm dicken Goldschicht bedeckt.

Insgesamt besteht für diesen Anwendungszweck die Sensoranordnung aus vier Elektroden. Eine der Elektroden ist als Referenzelektrode mit einer Silber/Silberchlorid(Ag/AgCl)-Schicht belegt, eine andere Elektrode wird als Gegenelektrode CE verwendet und die zwei weiteren Elektroden dienen als Messelektroden WE.

Auf einer der Messelektroden wird eine synthetische Oligonukleotidsequenz der Länge 25 mittels einer endständigen Thiolgruppe an der Goldoberfläche als Positivprobe verankert. Die zweite Messelektrode bleibt als Negativprobe frei. Dann wurden beide Oberflächen mit einer Lösung von 1 mg Rinderse-
rumalbumin pro ml 15 Minuten inkubiert und anschließend das Sensorarray in einen 100 µm tiefen Durchflusskanal eingesetzt. Zunächst werden 10 µl einer 10 µM biotinilierten Zielsequenz innerhalb von ca. 5 Minuten über die Elektroden gepumpt. Dann wird nach einem Waschschrift eine Lösung von Streptavidin markierter alkalischer Phosphatase darüber gegeben. Das Waschen erfolgt mit einer Pufferlösung von 100 mM

Tris(hydroxymethyl)aminomethan titriert auf pH 8 mit Salzsäure, 130 mM NaCl. Nach abermaligem Waschen wird eine 2 mM Lösung des Enzymsubstrats Paraaminophenylphosphat (pAPP) in der Pufferlösung über das Sensorarray gepumpt. Bei Anwesenheit
5 des Enzyms alkalische Phosphatase wird das Enzymsubstrat pAPP zu Paraaminophenol (pAP) umgesetzt.

Referenzelektrode RE, Gegenelektrode CE und jeweils eine der beiden Messelektroden WE sind jeweils in einer Dreielektrodenanordnung an einen Potentiostaten angeschlossen. Die Mes-
10 sung erfolgt mittels gepulstem Redoxcycling. Während der Messphase wird das vom Enzym gebildete Paraaminophenol zu Chinonimin oxidiert. Das Oxidationspotenzial ϕ_{ox} beträgt +200 mV vs. ϕ^0 . In der Relaxationsphase wird das gebildete
15 Chinonimin wieder zu Paraaminophenol reduziert bei $\phi_{Red} = -200$ mV. Die Pulslänge der Messphase beträgt 250 ms, die der Relaxationsphase 750 ms. Die Strommessung erfolgt 240 ms nach Beginn der Messphase.

Zu Beginn des Experiments ist die Positivprobe, also die Elektrode mit der Fängersequenz angeschlossen. Die Lösung mit dem Enzymsubstrat fließt - durch eine Pumpe gefördert - zu-
20 nächst über die Negativprobe und dann über die Positivprobe. Durch die Fließbewegung wird von dem Enzym gebildetes pAP von den Elektroden weggespült, so dass bei eingeschalteter Pumpe
25 der Strom konstant und gering ist. Wird nun die Pumpe gestoppt steigt die pAP-Konzentration durch die Enzymaktivität mit der Zeit an. In der Messung zeigt sich dies durch einen starken Anstieg des Stromsignals mit 20 nA/s. Wird die Pumpe
30 wieder eingeschaltet, so sinkt das Signal wieder auf den ursprünglichen Wert. Dieser Vorgang kann beliebig oft wiederholt werden.

Die Figur 12 zeigt den zeitlichen Stromverlauf bei Pumpe
35 "on"/"stopp" an der beschriebenen Sensoranordnung mit positiver und negativer Probe: Die Kennlinie 121 zeigt den Verlauf des Pumpenstroms. Es ergibt sich für das Experiment ein spe-

zifischer Verlauf mit einzelnen Peaks, wobei Parameter die Aktivierung der Pumpe einerseits ("stopp"/"on") und das Umschalten der Messelektroden andererseits ist. Der interessierende Messbereich ist jeweils strichliert unterlegt. Bei $t =$
5 400 s wurde auf die Negativprobe umgeschaltet. Hier sinkt der Strom beim Stoppen der Pumpe zunächst, bleibt dann kurze Zeit konstant und steigt dann langsam an. Dieser Anstieg wird durch die Diffusion von pAP von der positiven zur negativen Probe hin verursacht. Bei Pumpe "on" kommt ein Peakstrom hin-
10 zu, da der Elektrolyt zunächst von der positiven zur negativen Probe fließt und damit eine erhöhte pAP-Konzentration zur benachbarten Elektrode transportiert. Insgesamt ist die Diskriminierung von positiver und negativer Probe sehr gut.

15 In einer alternativen Messanordnung wird statt des freitragenden und flexiblen Transducer-Arrays entsprechend den Figuren 9 bis 11 ein Transducer-Array in Dünnschichttechnologie auf einem starren Substrat verwendet. Dabei sind flächige Elektroden vorhanden, die eine Ausdehnung haben, die größer als
20 die Diffusionslänge ist. Eine typische Diffusionslänge beträgt für das oben angegebene Beispiel 25 μm , so dass die flächigen Elektroden eine Ausdehnung $\geq 30 \mu\text{m}$, vorzugsweise $\geq 50 \mu\text{m}$, haben.

25 Das starre Substrat ist insbesondere Silizium, das vorzugsweise mit einer Isolatorschicht versehen ist.

Auch mit derartigen Transducern, welche den Zugang zur CMOS-Technologie bei der Signalverarbeitung ermöglichen, ist das
30 erfindungsgemäße Redoxcycling durchführbar.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Messung der Konzentration oder Konzentrationsänderung einer redoxaktiven Substanz als Mediator in einem molekulاربιologischen Detektionssystem, bei dem durch Anlegen geeigneter Potentiale an einer Arbeitselektrode ein Reduktionsvorgang oder ein Oxidationsvorgang als Redoxreaktion erfolgt, mit folgenden Maßnahmen:

- das Potenzial der Arbeitselektrode wird gepulst und es werden abwechselnd Messphasen sowie Relaxationsphasen gebildet,
- dabei werden die Messphasen-Pulslängen so gewählt, dass gegen Ende des Pulses der kapazitive Strom klein gegenüber dem Faraday'schen Strom ist und
- es werden die Relaxationsphasen-Pulslängen so gewählt, dass gegen Ende des Pulses der Konzentrationsgradient relaxiert ist, so dass zu Beginn der folgenden Messphase die Konzentrationsänderung des Mediators, verursacht durch den Verbrauch des Mediators durch die Messung selbst, weitestgehend rückgängig gemacht wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der am Ende der Messphase gemessene Strom das Messsignal bildet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass bei Messung von Oxidationsströmen während der Relaxationsphase ein hinreichendes Reduktionspotenzial eingestellt wird und die während der Messphase oxidierten und noch vor der Elektrode befindlichen Spezies wieder reduziert werden (so genanntes gepulstes Redoxcycling).

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass bei einer Messung von Reduktionsströmen während der Relaxationsphase ein hinreichendes Oxidationspotenzial eingestellt wird und die während der Messphase reduzierten und noch vor

der Elektrode befindlichen Spezies wieder oxidiert werden (so genanntes gepulstes Redoxcycling).

5 5. Verfahren nach Anspruch 3 oder Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Wiederholrate für das gepulste Redoxcycling wenigstens 1/10 Hz beträgt.

10 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das gepulste Redoxcycling mit vorgebbaren Impulsformen, vorzugsweise mit einem Rechteck-, Dreieck- oder Sinus-Verlauf, durchgeführt wird.

15 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Relaxationsphase wenigstens so lang ist wie die Messphase.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Relaxationsphase erheblich länger ist als die Messphase.

20 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass bei einer Wiederholrate von 1 Hz die Pulslängen der Messphasen 100 bis 300 ms, vorzugsweise 250 ms, und die Relaxationsphase zwischen 700 und 900 ms, vorzugsweise 750 ms, beträgt.

25 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Potenziale derart gewählt werden, dass die Reaktionen im Diffusionsgrenzstrombereich ablaufen.

30 11. Vorrichtung zur Durchführung des Messverfahrens nach Anspruch 1 oder einem der Ansprüche 2 bis 10, mit einer Einrichtung zum Erzeugen von zeitlich vorgebbaren und veränderbarenelektrischen Potenzialen und mit einem Transducer-Array
35 (100).

12. Vorrichtung zur nach Anspruch 11, , dadurch gekennzeichnet, dass das Transducer-Array (100) aus wenigstens einem flexiblen planaren Metallsubstrat (1) besteht, auf dem mindestens ein flexibler Isolator (2) mit fester Verbindung von Metalloberfläche und Isolatoroberfläche angeordnet ist, wobei das Metallsubstrat derart strukturiert ist, dass elektrisch gegeneinander isolierte Metallbereiche (10_i) vorliegen, und wobei der auf dem Metallsubstrat (1) befindliche Isolator (2) derart strukturiert ist, dass im Isolator (2) Kavitäten (3_i) mit offenen Metalloberflächen (101_i) definiert sind, wobei die Metallbereiche (10_i) von der der Sensorfläche (11_i) abgewandten bzw. gegenüberliegenden Seite (12_i) kontaktierbar sind.
13. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Transducer-Array (100) flächige Elektroden umfasst, deren kleinste Ausdehnung größer als typische Diffusionslängen ist.
14. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die flächige Elektroden eine Ausdehnung von wenigstens 30 µm, vorzugsweise 50 µm, haben.
15. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die flächigen Elektroden in Dünnschichttechnologie auf einem nichtleitenden, starren Substrat ausgebildet sind. (
16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das starre Substrat Silizium ist.
17. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass auf dem Substrat ein Isolator vorhanden ist.
18. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Einrichtung zum Erzeugen von vorgebbaren elektrischen Potenzialen ein Potentiostat (5) ist.

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass dem Potentiostaten (5) zum Erzeugen von gepulsten elektrischen Potenzialen ein Pulsgenerator (6) zugeordnet ist.

- 5 20. Vorrichtung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass im Potentiostaten (5) Operationsverstärker (7, 7') und ein definierter Messwiderstand (8) vorhanden sind.

FIG 1

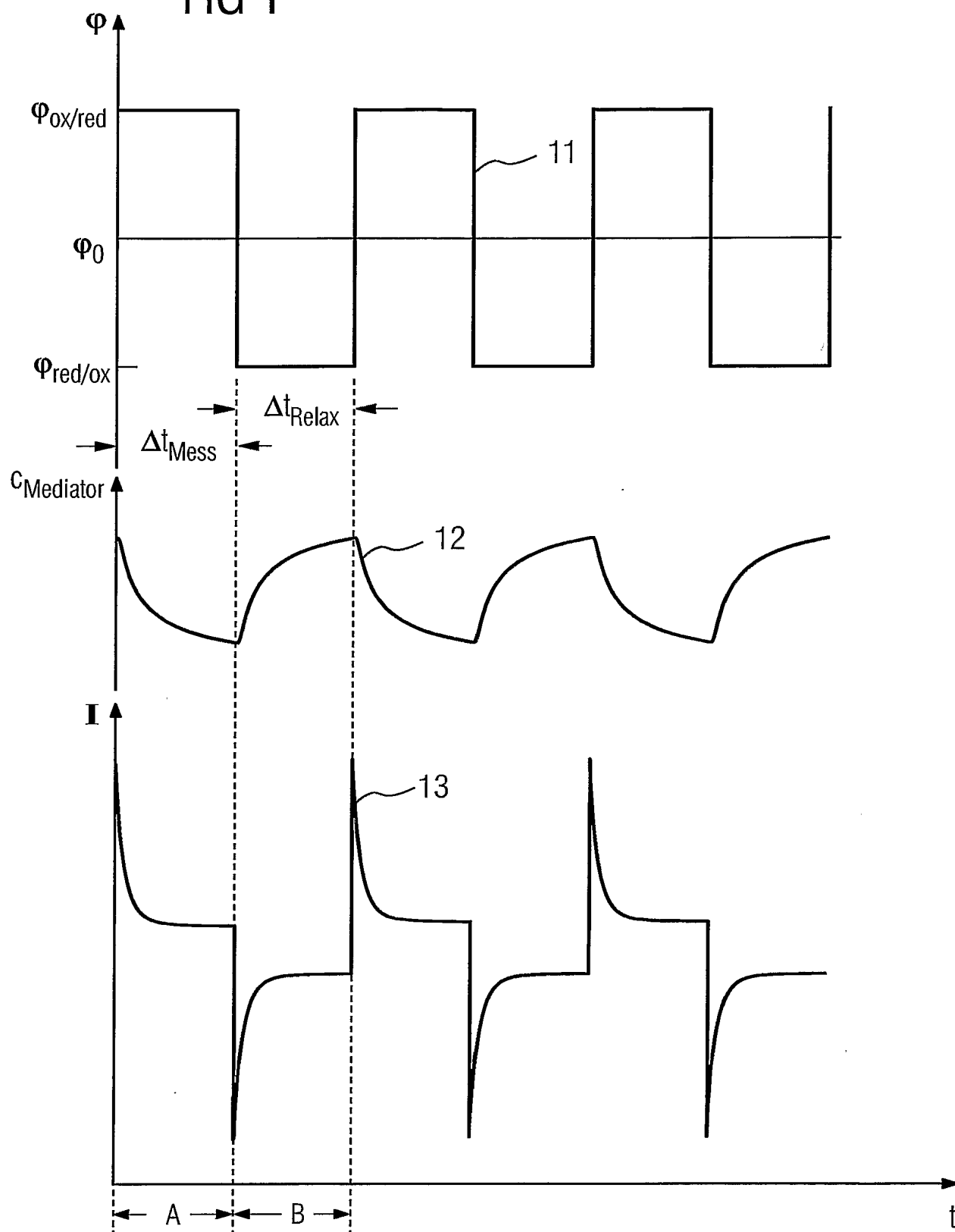


FIG 2

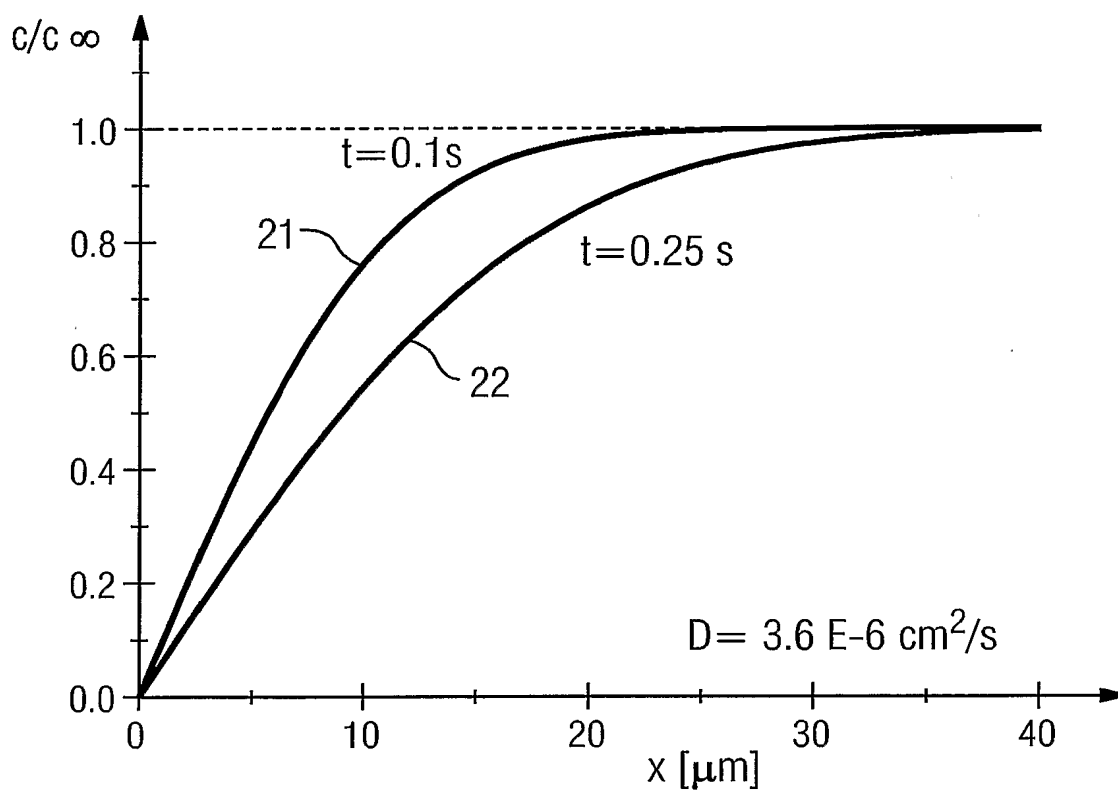


FIG 3

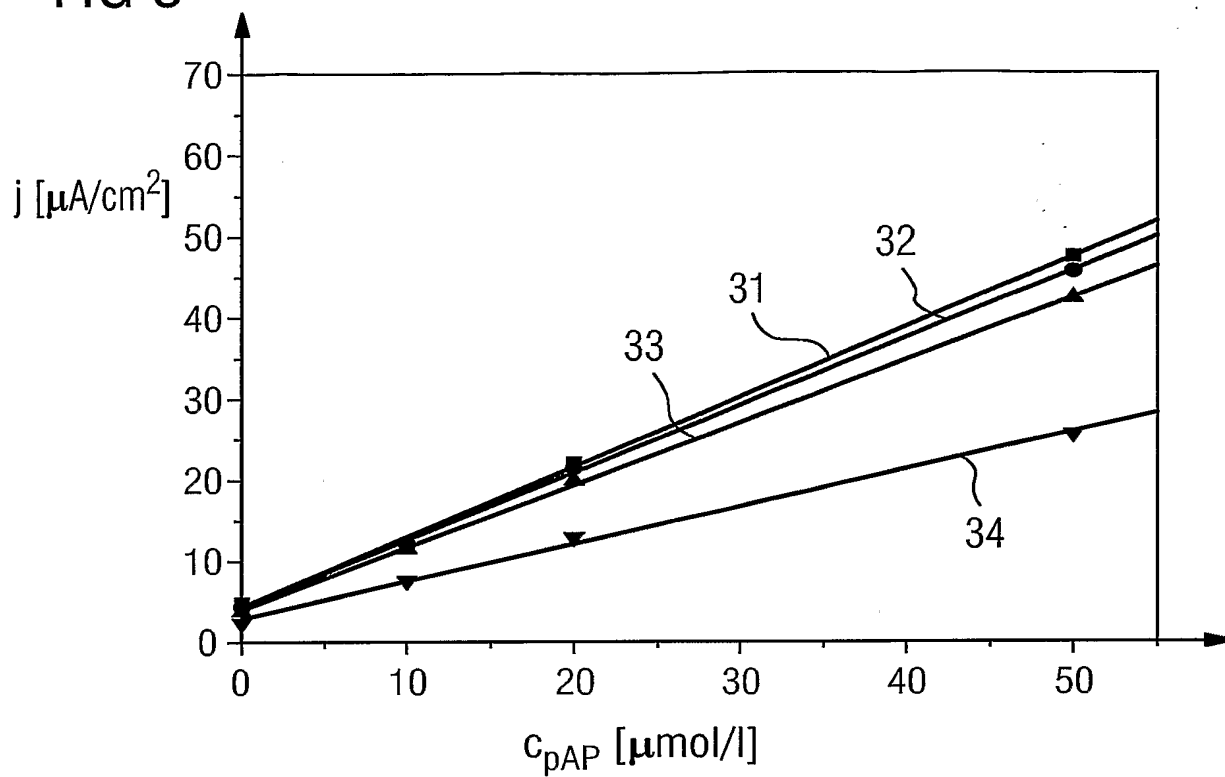


FIG 4

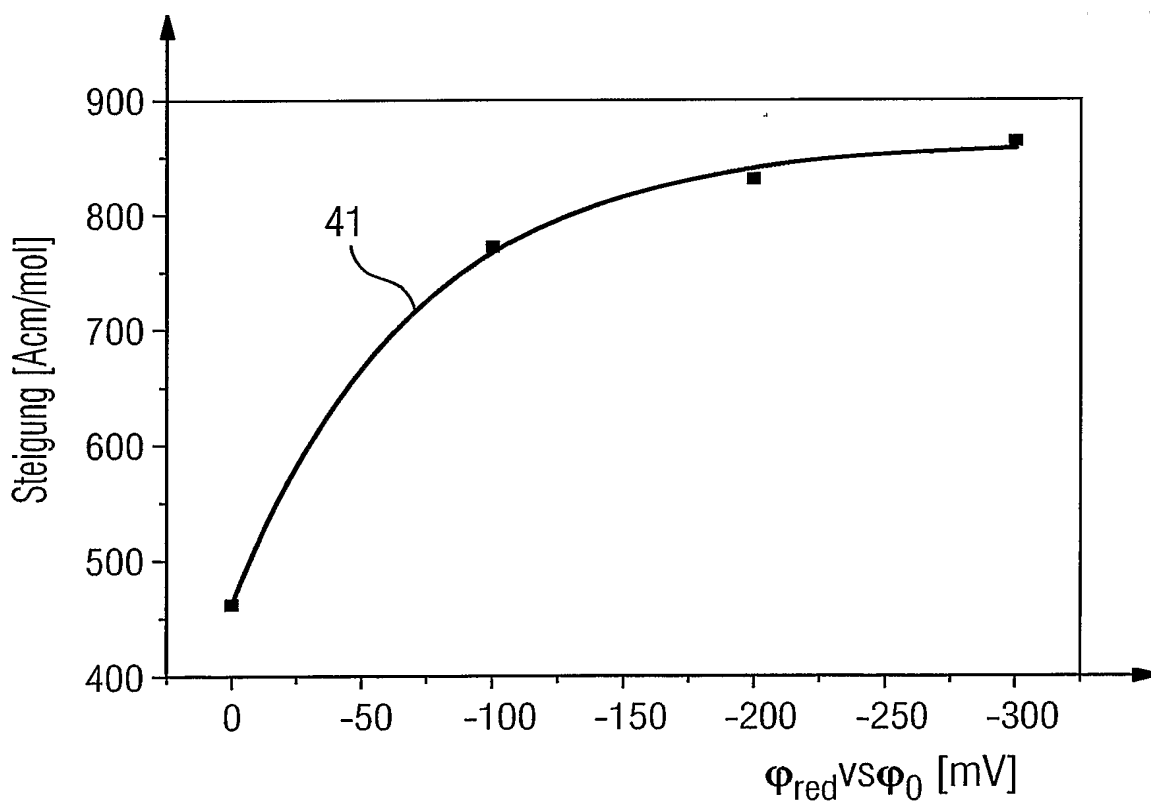


FIG 5

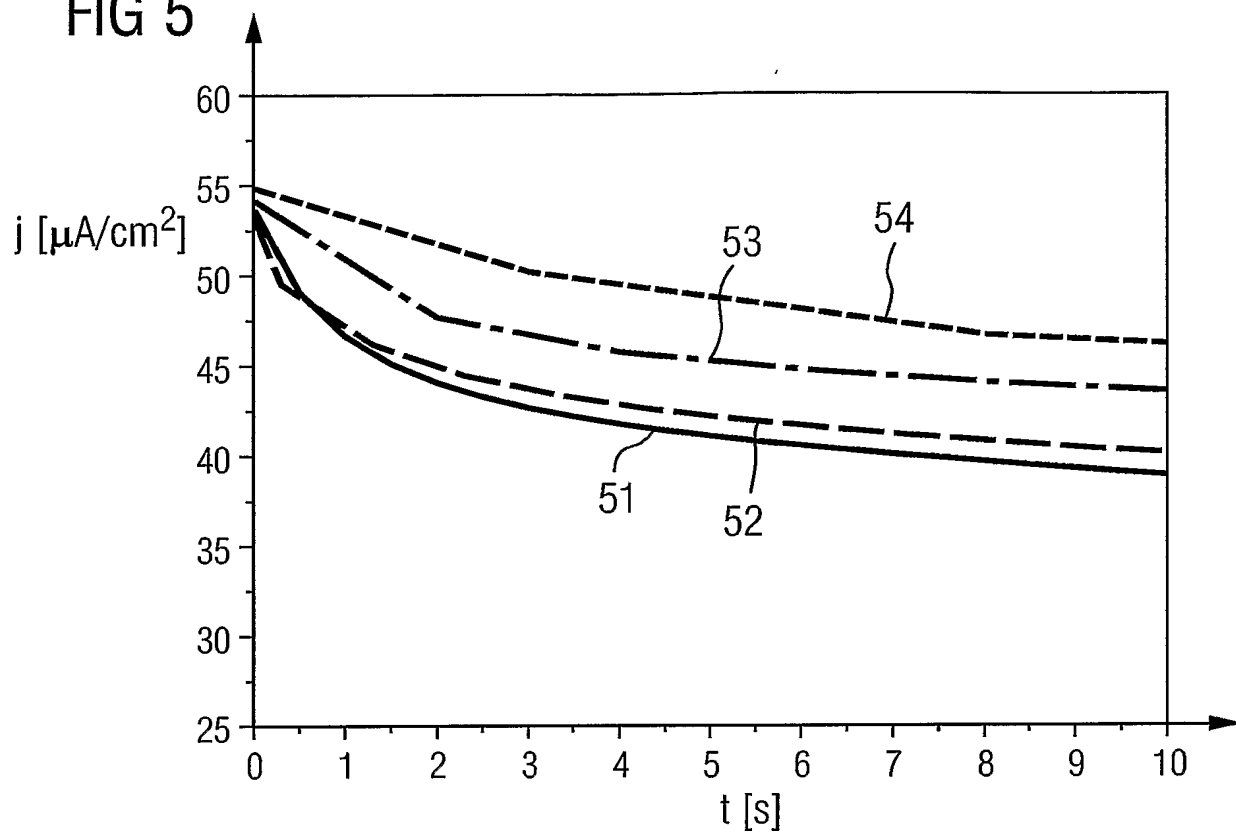
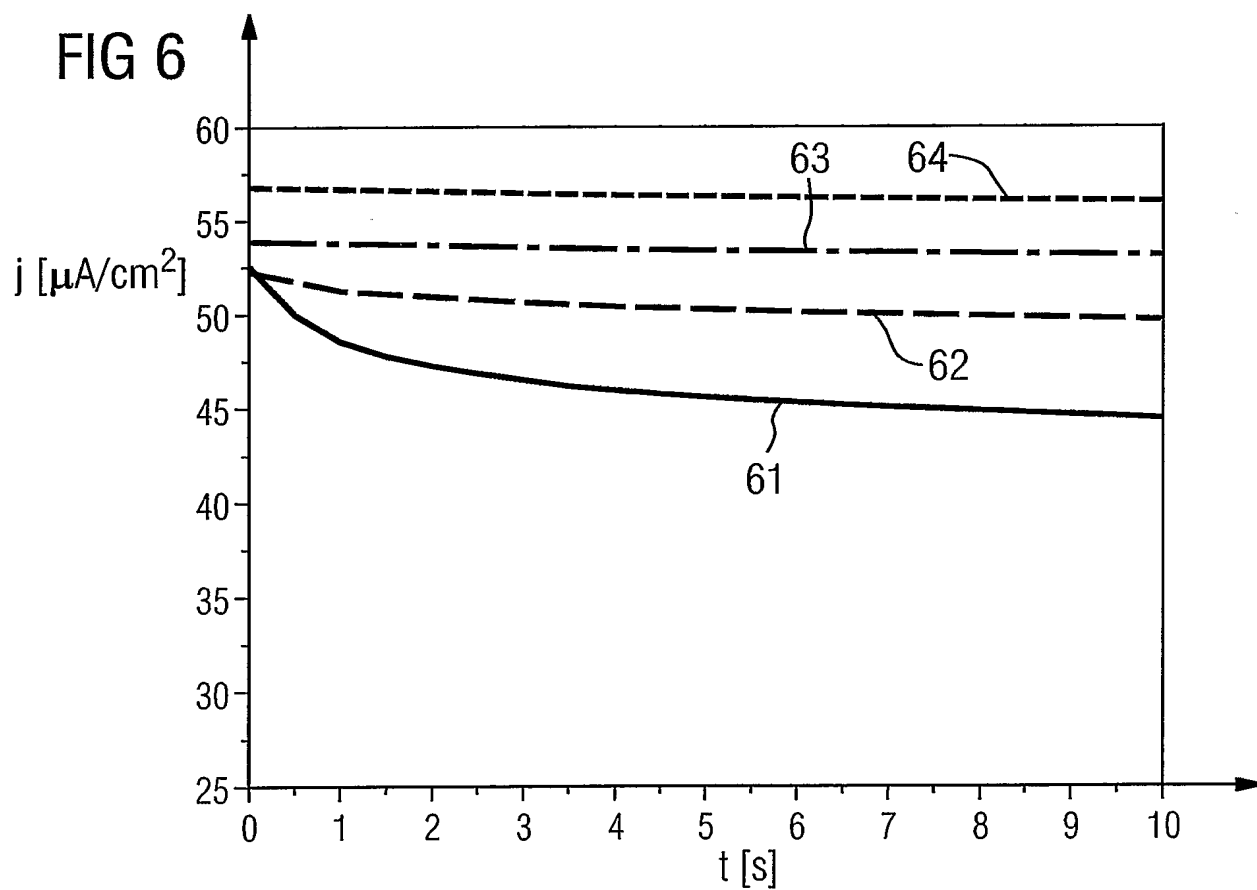


FIG 6



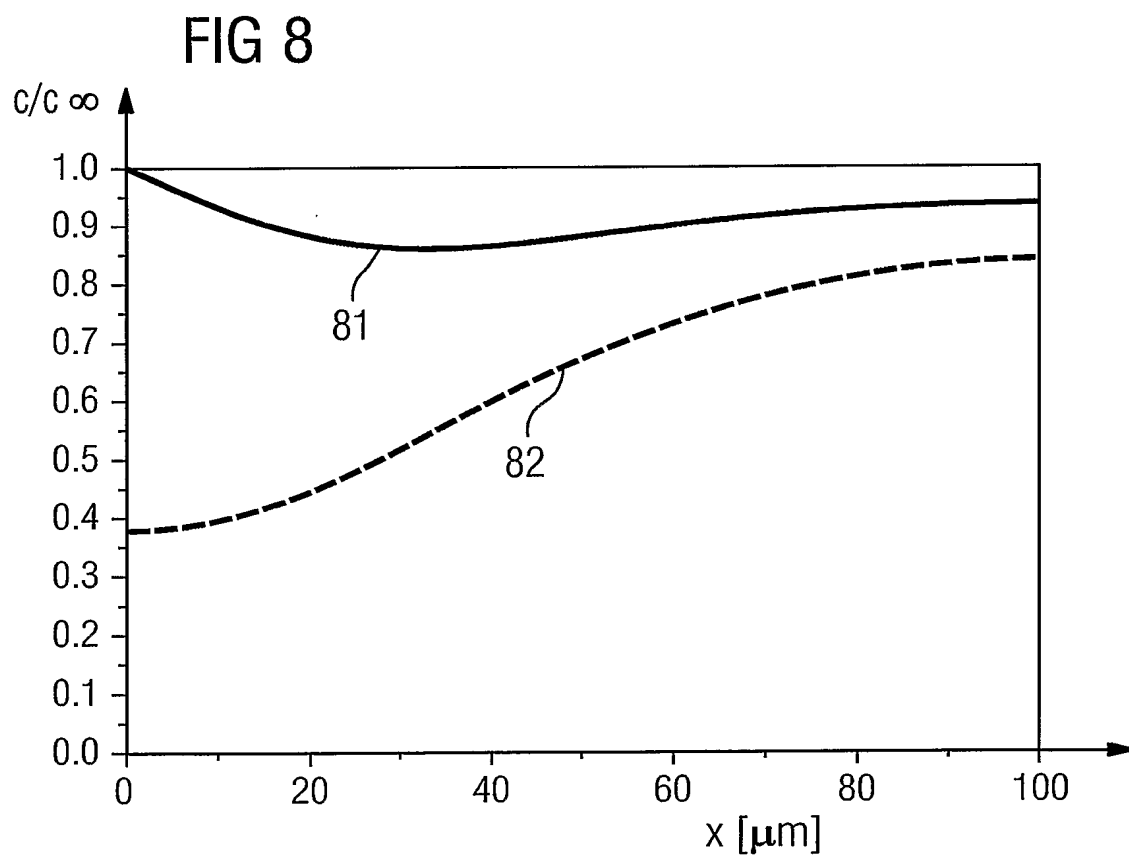
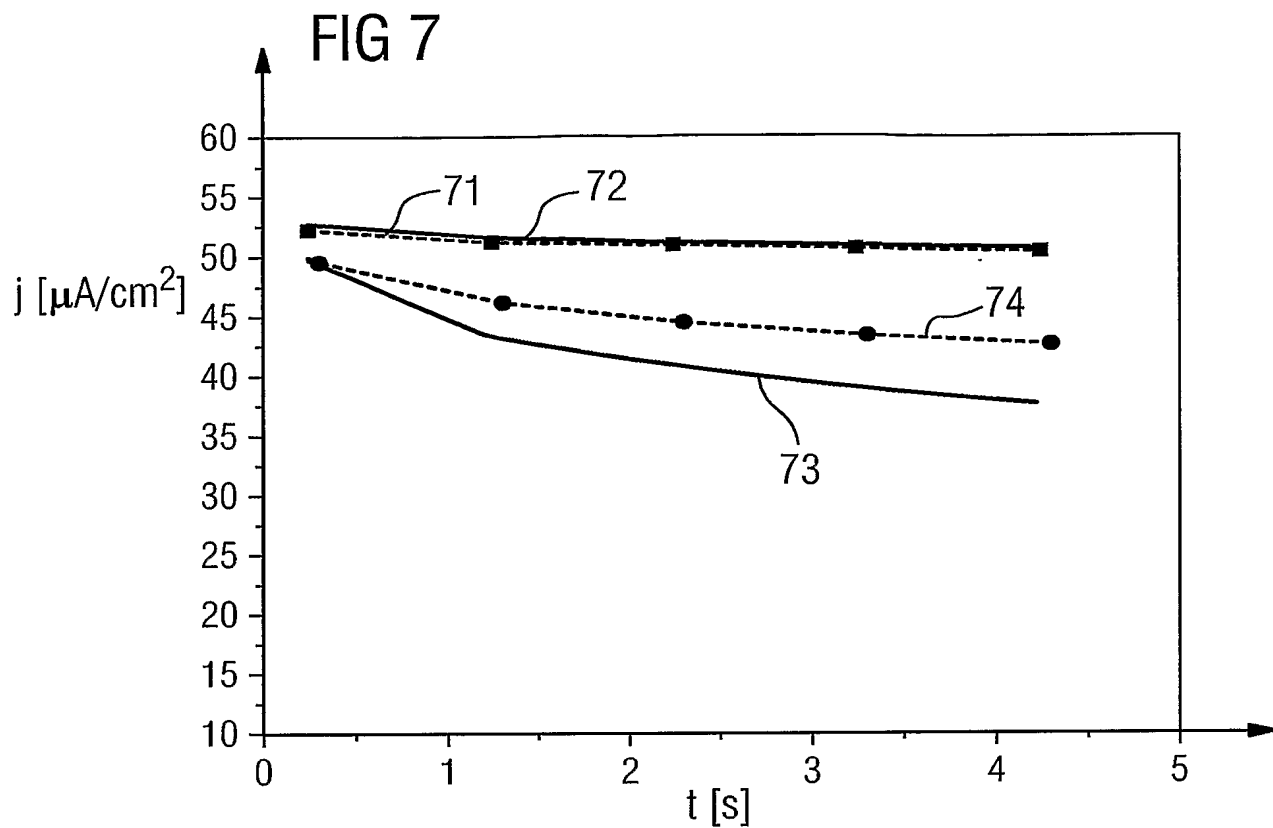


FIG 9

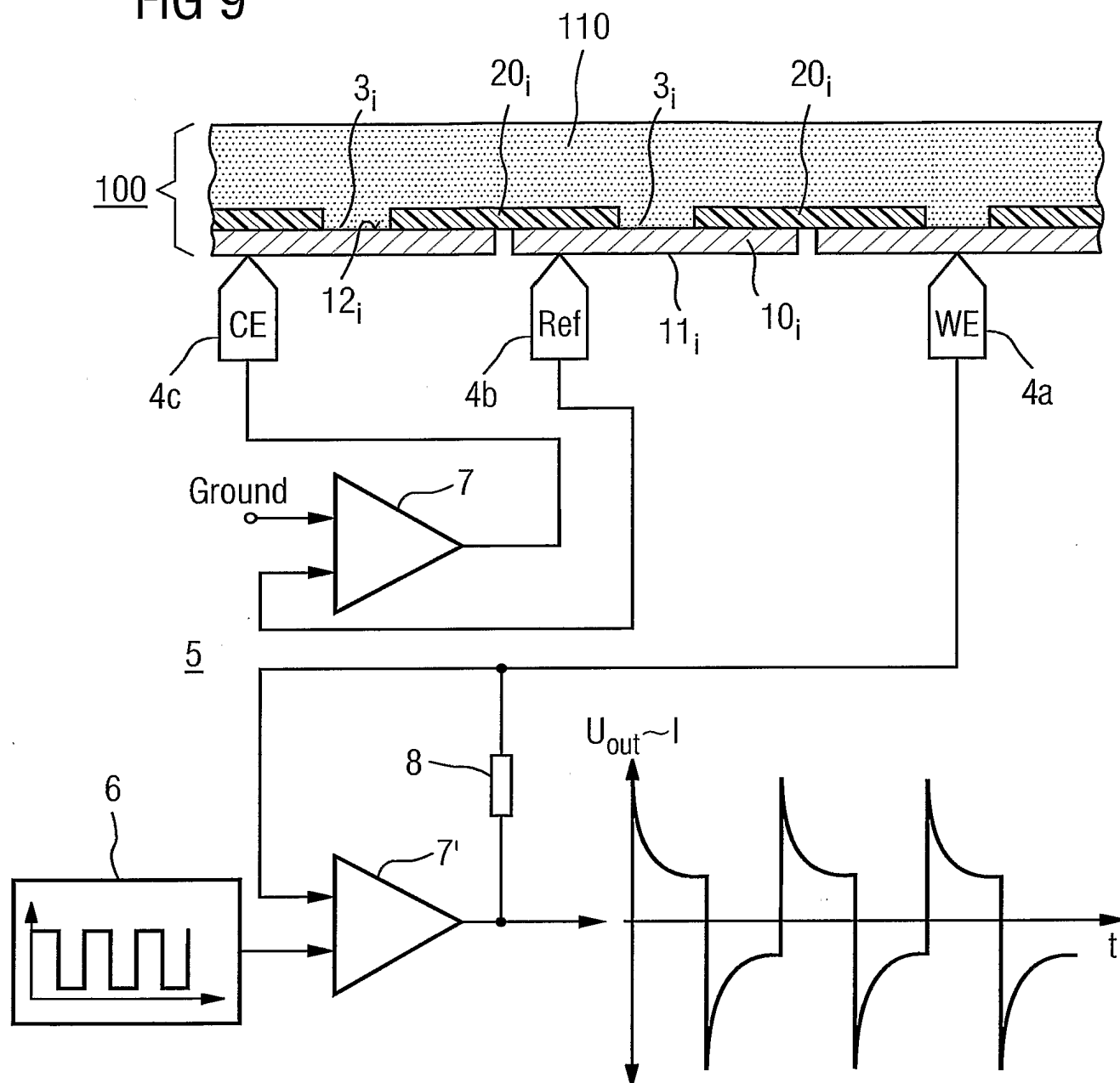


FIG 10

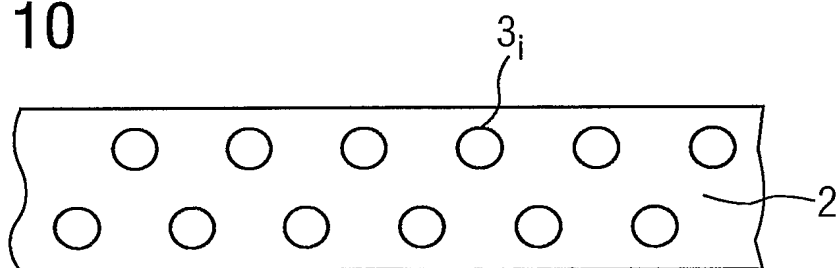


FIG 11

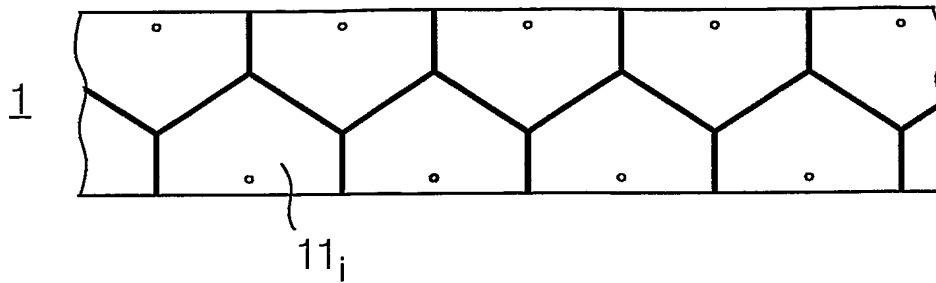


FIG 12

